



**PATENT APPLICATION**

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re the Application of

Yasuko YOSHIDA et al.

Group Art Unit: 1641

Application No.: 10/751,517

Examiner: J. DIRAMIO

Filed: January 6, 2004

Docket No.: 118254

For: REACTIVE CHIPS AND METHODS FOR DETECTING BINDINGS OF TARGET  
SUBSTANCES UTILIZING THE CHIPS

**CLAIM FOR PRIORITY**

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

The benefit of the filing date of the following prior foreign application filed in the following foreign country is hereby requested for the above-identified patent application and the priority provided in 35 U.S.C. §119 is hereby claimed:

Japanese Patent Application No. 2003-01577 filed January 7, 2003

In support of this claim, a certified copy of said original foreign application:

☒ is filed herewith.

It is requested that the file of this application be marked to indicate that the requirements of 35 U.S.C. §119 have been fulfilled and that the Patent and Trademark Office kindly acknowledge receipt of this document.

Respectfully submitted,

James A. Oliff  
Registration No. 27,075

Gang Luo  
Registration No. 50,559

JAO:GXL/sqb

Date: July 12, 2006

**OLIFF & BERRIDGE, PLC**  
**P.O. Box 19928**  
**Alexandria, Virginia 22320**  
**Telephone: (703) 836-6400**

**DEPOSIT ACCOUNT USE  
AUTHORIZATION**

Please grant any extension  
necessary for entry;  
Charge any fee due to our  
Deposit Account No. 15-0461

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日      2 0 0 3 年   1 月   7 日  
Date of Application:

出 願 番 号      特 願 2 0 0 3 - 0 0 1 5 7 7  
Application Number:  
[ST. 10/C] :      [ J P 2 0 0 3 - 0 0 1 5 7 7 ]

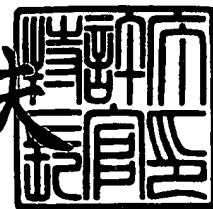
願      人  
Applicant(s):      日本碍子株式会社

CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT

2 0 0 4 年   3 月 1 6 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号   出証特 2 0 0 4 - 3 0 2 1 2 5 4

【書類名】 特許願

【整理番号】 NP02087-YS

【提出日】 平成15年 1月 7日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 G01N 33/53  
C07H 21/00

【発明の名称】 反応性チップと、このチップを用いた標的物質の  
結合検出方法

【請求項の数】 31

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県名古屋市瑞穂区須田町 2 番 5 6 号  
日本碍子株式会社内

【氏名】 吉田 安子

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県名古屋市瑞穂区須田町 2 番 5 6 号  
日本碍子株式会社内

【氏名】 廣田 寿一

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県名古屋市瑞穂区須田町 2 番 5 6 号  
日本碍子株式会社内

【氏名】 武内 幸久

【特許出願人】

【識別番号】 000004064

【氏名又は名称】 日本碍子株式会社

【代理人】

【識別番号】 100093230

【弁理士】

【氏名又は名称】 西澤 利夫

【電話番号】 03-5454-7191

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 009911

【納付金額】 21,000円

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 反応性チップと、このチップを用いた標的物質の結合検出方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 基板上に整列配置された 3 以上の振動面のそれぞれに、標的物質に結合するキャプチャプローブが固定されていることを特徴とする反応性チップ。

【請求項 2】 各振動面がそれぞれ、第 1 電極と第 2 電極間に圧電／電歪素子を介在させた振動発生部を有する請求項 1 の反応性チップ。

【請求項 3】 キャプチャプローブの固定面がコーティングされている請求項 2 の反応性チップ。

【請求項 4】 基板が肉薄領域とその周囲の肉厚領域を有し、肉薄領域の上面に振動発生部を有する請求項 2 または 3 の反応性チップ。

【請求項 5】 基板が肉薄領域とその周囲の肉厚領域を有し、肉薄領域の下面に振動発生部を有する請求項 2 または 3 の反応性チップ。

【請求項 6】 第 1 電極と第 2 電極のそれぞれのリード線が、振動発生部毎に独立である請求項 2 から 5 のいずれかの反応性チップ。

【請求項 7】 第 1 電極と第 2 電極のいずれか一方のリード線が共通である請求項 2 から 5 のいずれかの反応性チップ。

【請求項 8】 振動面の共振周波数を測定する手段を有する請求項 2 から 7 のいずれかの反応性チップ。

【請求項 9】 第 1 電極表面がキャプチャプローブ固定面であり、第 1 電極および第 2 電極が、交流電源に加え、さらに直流電源にも導通している請求項 2 から 7 のいずれかの反応性チップ。

【請求項 10】 各振動面に、それぞれ異種のキャプチャプローブを固定した請求項 2 から 7 のいずれかの反応性チップ。

【請求項 11】 圧電／電歪素子の共振周波数を測定する手段を有する請求項 10 の反応性チップ。

【請求項 12】 第 1 電極表面がキャプチャプローブ固定面であり、第 1 電極および第 2 電極が、交流電源に加え、さらに直流電源にも導通している請求

項 10 の反応性チップ。

【請求項 13】 3 以上の振動面を同一列、または 4 以上の振動面を  $n$  ( $n$  は 2 以上)  $\times m$  ( $m$  は 2 以上) の格子状に整列配置し、同一列の各振動面に同一種のキャプチャプローブを固定した請求項 2 から 7 の反応性チップ。

【請求項 14】 振動面の共振周波数を測定する手段を有する請求項 13 の反応性チップ。

【請求項 15】 第 1 電極表面がキャプチャプローブ固定面であり、第 1 電極および第 2 電極が、交流電源に加え、さらに直流電源にも導通している請求項 13 の反応性チップ。

【請求項 16】 3 以上の振動面を同一列、または 4 以上の振動面を  $n$  ( $n$  は 2 以上)  $\times m$  ( $m$  は 2 以上) の格子状に整列配置し、同一列の振動面に、標的物質の異なる部位に結合するキャプチャプローブをそれぞれ固定した請求項 2 から 7 の反応性チップ。

【請求項 17】 振動面の共振周波数を測定する手段を有する請求項 16 の反応性チップ。

【請求項 18】 第 1 電極表面がキャプチャプローブ固定面であり、第 1 電極および第 2 電極が、交流電源に加え、さらに直流電源にも導通している請求項 16 の反応性チップ。

【請求項 19】 キャプチャプローブと結合する標的物質を検出する方法であって、請求項 10 の反応性チップの振動面を振動させた状態で、標識化標的物質を含む試料を反応性チップのキャプチャプローブに接触させ、振動面の振動を停止し、標識を指標としてキャプチャプローブに結合した標的物質を検出することを特徴とする標的物質の検出方法。

【請求項 20】 振動面を振動させると共に、温度を経時的に変化させた状態で試料をキャプチャプローブに接触させる請求項 19 の検出方法。

【請求項 21】 キャプチャプローブと結合する標的物質を検出する方法であって、請求項 11 の反応性チップの振動面を振動させた状態で、標的物質を含む試料を反応性チップのキャプチャプローブに接触させ、振動面の共振周波数の変化を指標として標的物質を検出する標的物質の検出方法。

【請求項 2 2】 反応性チップの振動面を振動させると共に、温度を経時的に変化させた状態でキャプチャプローブに試料を接触させ、振動面の共振周波数の変化を指標として標的物質を経時的に検出する請求項 2 1 の検出方法。

【請求項 2 3】 キャプチャプローブと結合する標的物質を検出する方法であって、請求項 1 2 の反応性チップの振動面を振動させた状態で、標識化標的物質を含む試料を反応性チップのキャプチャプローブに接触させ、振動面の振動を停止した後、キャプチャプローブ固定面である第 1 電極に負の直流電流を一定時間通電し、標識を指標としてキャプチャプローブに結合した標的物質を検出することを特徴とする標的物質の検出方法。

【請求項 2 4】 複数種の標的物質のキャプチャプローブに対する親和性を検出する方法であって、請求項 1 3 の反応性チップの同一列振動面の各振動面を異なる振幅で振動させた状態で、各種の標識化標的物質を反応性チップのキャプチャプローブに接触させ、振動面の振動を停止し、標識を指標としてキャプチャプローブに結合した標的物質のそれぞれのキャプチャプローブに対する親和性の程度を検出することを特徴とする標的物質の検出方法。

【請求項 2 5】 振動面を振動させると共に、温度を経時的に変化させた状態で試料をキャプチャプローブに接触させる請求項 2 4 の検出方法。

【請求項 2 6】 複数種の標的物質のキャプチャプローブに対する親和性を検出する方法であって、請求項 1 4 の反応性チップの同一列振動面を異なる振幅で振動させた状態で、標的物質を反応性チップのキャプチャプローブに接触させ、振動面の共振周波数の変化を指標として標的物質のそれぞれのキャプチャプローブに対する親和性の程度を検出する標的物質の検出方法。

【請求項 2 7】 反応性チップの振動面を振動させると共に、温度を経時的に変化させた状態でキャプチャプローブに試料を接触させ、振動面の共振周波数の変化を指標として標的物質の有無を経時的に検出する請求項 2 6 の検出方法。

【請求項 2 8】 複数種の標的物質のキャプチャプローブに対する親和性を検出する方法であって、請求項 1 5 の反応性チップの同一列振動面の各振動面を異なる振幅で振動させた状態で、各種の標識化標的物質を反応性チップのキャ

プチャープローブに接触させ、振動面の振動を停止した後、プローブ固定面である第1電極に負の直流電流を一定時間通電し、標識を指標としてキャプチャープローブに結合した標的物質のそれぞれのプローブに対する親和性の程度を検出することを特徴とする標的物質の検出方法。

【請求項29】 標記物質の変異を検出する方法であって、請求項16の反応性チップの同一列振動面を振動させた状態で、標識化標的物質含む試料を反応性チップのキャプチャープローブに接触させ、振動面の振動を停止し、標識を指標としてキャプチャープローブに結合した標的物質を検出することによって、標的物質の変異を検出することを特徴とする標的物質の検出方法。

【請求項30】 標記物質の変異を検出する方法であって、請求項17の反応性チップの同一列振動面を振動させた状態で、標的物質を含む試料を反応性チップのキャプチャープローブに接触させ、振動面の共振周波数の変化を指標として標的物質の有無を検出することによって、標的物質の変異を検出することを特徴とする標的物質の検出方法。

【請求項31】 標記物質の変異を検出する方法であって、請求項18の反応性チップの同一列振動面を振動させた状態で、標識化標的物質含む試料を反応性チップのキャプチャープローブに接触させ、振動面の振動を停止した後、プローブ固定面である第1電極に負の直流電流を一定時間通電し、標識を指標としてキャプチャープローブに結合した標的物質を検出することによって、標的物質の変異を検出することを特徴とする標的物質の検出方法。

#### 【発明の詳細な説明】

#### 【0001】

#### 【発明の属する技術分野】

この出願の発明は、反応性チップと、このチップを用いた標的物質の検出方法に関するものである。さらに詳しくは、標的物質とキャプチャープローブとのミスハイブリダイゼーションを排除することができ、しかも短時間による正確な検出が可能であり、さらには検出の手段や対象を様々に選択することのできる新しい反応性チップと、このチップを用いた標的物質の新しい検出方法に関するものである。



## 【0002】

## 【従来の技術】

遺伝子の構造や遺伝子発現様式の大量かつ迅速な解析を目的として、様々な反応性チップが用いられている。この反応性チップは、スライドガラス等の基板上に数千から数万種以上の異なるキャプチャープローブがスポットとして整列固定されており、蛍光等によって標識した標的物質のキャプチャープローブへの結合の有無を指標として、標的物質の特定やサンプル中における標的物質の量を定量することができるようになっている。チップ上に固定されるキャプチャープローブは、解析する標的物質の種類によって異なる。例えばDNAやRNAが標的物質となる場合は、それらと相補性結合（ハイブリダイゼーション）が可能な2本鎖および1本鎖DNA断片やポリヌクレオチド鎖、オリゴヌクレオチド鎖等がキャプチャープローブとして採用され、これらはDNAチップ（またはDNAアレイ）と呼ばれている（例えば、特許文献1-4、非特許文献1、2を参照）。また、タンパク質チップの場合には、タンパク質やペプチドと、それらと特異的に結合する受容体や抗体が、標的物質-キャプチャープローブの関係を構成する。

## 【0003】

反応性チップにおける標的物質の結合は、例えば、標識化標的物質を含む試料（サンプル溶液）を反応性チップに接触させ、一定時間反応させて標的物質をキャプチャープローブに結合させ、非結合の物質を除去した後、反応性チップ上の標識位置を検出することによって、標的物質がどのキャプチャープローブに結合したかを判定する。また、標識シグナルの強度を測定することによって、標的物質の量を定量化することも可能である。

## 【0004】

## 【特許文献1】

米国特許第5,474,796号明細書

## 【特許文献2】

米国特許第5,605,662号明細書

## 【特許文献3】

国際公開第95/251116号パンフレット

**【特許文献 4】**

国際公開第95/35505号パンフレット

**【非特許文献 1】**

Schena, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93:10614-10619, 199

6

**【非特許文献 2】**

Heller, R. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:2150-2155, 199

7

**【0 0 0 5】****【発明が解決しようとする課題】**

従来の反応性チップの場合には、サンプル溶液中の標的物質が自然拡散によって対応するキャプチャープローブに接近し、結合することができるように、サンプル溶液と反応性チップとを長時間に渡って反応させていた。このため、検出結果を得るまでに、多くの時間を必要とするという問題点を有していた。

**【0 0 0 6】**

また、反応性チップによる標的物質の検出精度は、標的物質とキャプチャープローブとの特異的な結合に依存している。例えばDNAチップの場合、標的DNAとプローブDNAが互いの完全な相補性によって結合することが理想であるが、実際には、数個のミスマッチによっても標的DNAはプローブDNAに結合してしまう可能性がある。特に、標的DNAがサンプル溶液中で自然拡散によりプローブDNAに接近した場合には、このミスマッチ結合（ミスハイブリダイゼーション）の危険性は極めて高かった。

**【0 0 0 7】**

このような問題点を解決するDNAチップとして、特表2001-501301号公報の発明（ナノチップ）が知られている。このナノチップは、電極表面にプローブDNAを固定し、この電極に正の直流電流を通電した状態で標的DNAとプローブDNAとをハイブリダイゼーションさせる。DNA断片（標的DNA）は負に電荷しているため、正の電荷をもつプローブDNAに短時間で接近し、結合することができる。そして、ハイブリダイゼーション反応が終了した後は、電極に負の直流電流を流す。これ

によって、プローブDNAと標的DNAが共に負に電荷した状態となり、プローブDNAに対してミスマッチ結合している標的DNAはプローブDNAから排斥され、正しい相補性によって結合した標的DNAのみがプローブDNAに残る。

#### 【0008】

ただし、このナノチップの場合には、DNAが通常は負に電荷していることを利用しているため、タンパク質やペプチドを利用するタンパク質チップには適用することができない。

#### 【0009】

この出願の発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであって、広範な標的物質に対して、反応時間の短縮を可能とし、しかもミスマッチ結合を効果的に予防して高精度な検出を可能とする新しい反応性チップを提供することを課題としている。

#### 【0010】

またこの出願の発明は、前記の反応性チップを用いた新しい標的物質検出方法を提供することを課題としている。

#### 【0011】

##### 【課題を解決するための手段】

この出願の第1の発明は、基板上に整列配置された3以上の振動面のそれぞれに、標的物質に結合するキャプチャープローブが固定されていることを特徴とする反応性チップである。

#### 【0012】

第2の発明は、前記第1発明の一態様であって、各振動面がそれぞれ、第1電極と第2電極間に圧電／電歪素子を介在させた振動発生部を有する反応性チップである。

#### 【0013】

第3の発明は、前記第2発明の一態様であって、キャプチャープローブ固定面がコーティングされている反応性チップである。

#### 【0014】

第4の発明は、前記第2または第3発明の一態様であって、基板が肉薄領域と

その周囲の肉厚領域を有し、肉薄領域の上面に振動発生部を有する反応性チップである。

【0015】

第5の発明は、前記第2または第3発明の別の態様であって、基板が肉薄領域とその周囲の肉厚領域を有し、肉薄領域の下面に振動発生部を有する反応性チップである。

【0016】

第6の発明は、前記第2から第5発明の一態様であって、第1電極と第2電極のそれぞれのリード線が、振動発生部毎に独立である反応性チップである。

【0017】

第7の発明は、前記第2から第5発明の別の態様であって、第1電極と第2電極のいずれか一方のリード線が共通である反応性チップである。

【0018】

第8の発明は、前記第2から第7発明の一態様であって、圧電／電歪素子の共振周波数を測定する手段を有する反応性チップである。

【0019】

第9の発明は、前記第2から第7発明の別の態様であって、第1電極表面がキャプチャプローブ固定面であり、第1電極および第2電極が、交流電源に加え、さらに直流電源にも導通している反応性チップである。

【0020】

第10の発明は、前記第2から第7発明のさらに別の態様であって、各振動面に、それぞれ異種のキャプチャプローブを固定した反応性チップである。

【0021】

第11の発明は、前記第10発明の一態様であって、圧電／電歪素子の共振周波数を測定する手段を有する反応性チップである。

【0022】

第12発明は、前記第10発明の別の態様であって、第1電極表面がキャプチャプローブ固定面であり、第1電極および第2電極が、交流電源に加え、さらに直流電源にも導通している反応性チップである。

**【0023】**

第13発明は、前記第2から第7発明のさらにまた別の態様であって、3以上の振動面を同一列、または4以上の振動面を  $n$  ( $n$ は2以上)  $\times$   $m$  ( $m$ は2以上) の格子状に整列配置し、同一列の各振動面に同一種のキャプチャプローブを固定した反応性チップである。

**【0024】**

第14の発明は、前記第13発明の一態様であって、圧電／電歪素子の共振周波数を測定する手段を有する反応性チップである。

**【0025】**

第15の発明は、前記第13発明の別の態様であって、第1電極表面がキャプチャプローブ固定面であり、第1電極および第2電極が、交流電源に加え、さらに直流電源にも導通している反応性チップである。

**【0026】**

第16の発明は、前記第2から第7発明のまたさらに別の態様であって、3以上の振動面を同一列、または4以上の振動面を  $n$  ( $n$ は2以上)  $\times$   $m$  ( $m$ は2以上) の格子状に整列配置し、同一列の振動面に、標的物質の異なる部位に結合するキャプチャプローブをそれぞれ固定した反応性チップである。

**【0027】**

第17の発明は、前記第16発明の一態様であって、圧電／電歪素子の共振周波数を測定する手段を有する反応性チップである。

**【0028】**

第18の発明は、前記第16発明の別の態様であって、第1電極表面がキャプチャプローブ固定面であり、第1電極および第2電極が、交流電源に加え、さらに直流電源にも導通している反応性チップである。

**【0029】**

第19の発明は、キャプチャプローブと結合する標的物質を検出する方法であって、前記第10発明の反応性チップの振動面を振動させた状態で、標識化標的物質を含む試料を反応性チップのキャプチャプローブに接触させ、振動面の振動を停止し、標識を指標としてキャプチャプローブに結合した標的物質を検

出することを特徴とする標的物質の検出方法である。

#### 【0 0 3 0】

第 2 0 の発明は、第 1 9 発明の一態様であって、振動面を振動させると共に、温度を経時的に変化させた状態で試料をキャプチャプローブに接触させる検出方法である。

#### 【0 0 3 1】

第 2 1 の発明は、キャプチャプローブと結合する標的物質を検出する方法であって、前記第 1 1 発明の反応性チップの振動面を振動させた状態で、標的物質を含む試料を反応性チップのプローブに接触させ、圧電／電歪素子の共振周波数の変化を指標として標的物質を検出する標的物質の検出方法である。

#### 【0 0 3 2】

第 2 2 の発明は、前記第 2 1 発明の一態様であって、反応性チップの振動面を振動させると共に、温度を経時的に変化させた状態でプローブに試料を接触させ、圧電／電歪素子の共振周波数の変化を指標として標的物質を経時的に検出する検出方法である。

#### 【0 0 3 3】

第 2 3 の発明は、キャプチャプローブと結合する標的物質を検出する方法であって、前記第 1 2 発明の反応性チップの振動面を振動させた状態で、標識化標的物質を含む試料を反応性チップのプローブに接触させ、振動面の振動を停止した後、キャプチャプローブ固定面である第 1 電極に負の直流電流を一定時間通電し、標識を指標としてキャプチャプローブに結合した標的物質を検出することを特徴とする標的物質の検出方法である。

#### 【0 0 3 4】

第 2 4 の発明は、複数種の標的物質のキャプチャプローブに対する親和性を検出する方法であって、前記第 1 3 発明の反応性チップの同一列振動面の各振動面を異なる振幅で振動させた状態で、各種の標識化標的物質を反応性チップのキャプチャプローブに接触させ、振動面の振動を停止し、標識を指標としてキャプチャプローブに結合した標的物質のそれぞれのプローブに対する親和性の程度を検出することを特徴とする標的物質の検出方法である。

**【 0 0 3 5 】**

第 2 5 の発明は、前記第 2 4 発明の一態様であって、振動面を振動させると共に、温度を経時的に変化させた状態で試料をキャプチャプローブに接触させる検出方法である。

**【 0 0 3 6 】**

第 2 6 の発明は、複数種の標的物質のキャプチャプローブに対する親和性を検出する方法であって、前記第 1 4 発明の反応性チップの同一列振動面を異なる振幅で振動させた状態で、標的物質を反応性チップのキャプチャプローブに接触させ、圧電／電歪素子の共振周波数の変化を指標として標的物質のそれぞれのキャプチャプローブに対する親和性の程度を検出する標的物質の検出方法である。

**【 0 0 3 7 】**

第 2 7 の発明は、前記第 2 6 発明の一態様であって、反応性チップの振動面を振動させると共に、温度を経時的に変化させた状態でキャプチャプローブに試料を接触させ、圧電／電歪素子の共振周波数の変化を指標として標的物質の有無を経時的に検出する検出方法である。

**【 0 0 3 8 】**

第 2 8 の発明は、複数種の標的物質のキャプチャプローブに対する親和性を検出する方法であって、前記第 1 5 発明の反応性チップの同一列振動面の各振動面を異なる振幅で振動させた状態で、各種の標識化標的物質を反応性チップのキャプチャプローブに接触させ、振動面の振動を停止した後、プローブ固定面である第 1 電極に負の直流電流を一定時間通電し、標識を指標としてキャプチャプローブに結合した標的物質のそれぞれのプローブに対する親和性の程度を検出することを特徴とする標的物質の検出方法である。

**【 0 0 3 9 】**

第 2 9 の発明は、標記物質の変異を検出する方法であって、前記第 1 6 発明の反応性チップの同一列振動面を振動させた状態で、標識化標的物質含む試料を反応性チップのキャプチャプローブに接触させ、振動面の振動を停止し、標識を指標としてキャプチャプローブに結合した標的物質を検出することによって、

標的物質の変異を検出することを特徴とする標的物質の検出方法である。

第 3 0 の発明は、標記物質の変異を検出する方法であって、前記第 1 7 発明の反応性チップの同一列振動面を振動させた状態で、標的物質を含む試料を反応性チップのキャプチャープローブに接触させ、圧電／電歪素子の共振周波数の変化を指標として標的物質の有無を検出することによって、標的物質の変異を検出することを特徴とする標的物質の検出方法である。

#### 【 0 0 4 0 】

第 3 1 の発明は、標記物質の変異を検出する方法であって、前記第 1 8 発明の反応性チップの同一列振動面を振動させた状態で、標識化標的物質含む試料を反応性チップのキャプチャープローブに接触させ、振動面の振動を停止した後、プローブ固定面である第 1 電極に負の直流電流を一定時間通電し、標識を指標としてキャプチャープローブに結合した標的物質を検出することによって、標的物質の変異を検出することを特徴とする標的物質の検出方法である。

#### 【 0 0 4 1 】

以下、前記の各発明について、それぞれの実施形態を詳しく説明する。

#### 【 0 0 4 2 】

##### 【発明の実施の形態】

この出願の第 1 発明は、基板上に整列配置された 3 以上の振動面のそれぞれに、標的物質に結合するキャプチャープローブが固定されていることを特徴とする反応性チップである。

#### 【 0 0 4 3 】

「基板」は、通常の DNA チップやタンパク質チップ等に使用されるスライドガラス板やセラミックス板、プラスチック等の樹脂板、金属板等である。「キャプチャープローブ」は、標的物質と特異的に結合する生体分子である。例えば、標的物質がゲノム DNA 由来の DNA 断片（例えば cDNA 等）の場合には、キャプチャープローブは、相補性に基づいてこれら DNA 断片とハイブリダイズする 1 本鎖の DNA 断片、RNA 断片、ヌクレオチド鎖（100 塩基以上のポリヌクレオチドまたは 100 塩基未満のオリゴヌクレオチド）等である。また、標的物質がタンパク質の場合は、



そのアミノ酸配列の一部に特異的に結合するタンパク質（例えばレセプタータンパク質）やペプチド等、あるいはタンパク質のエピトープに結合することができる抗体またはそのFab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv断片等をキャプチャプローブとすることもできる。さらには、糖鎖を有する複合生体分子、生体組織片、細胞、酵母等の微生物をキャプチャプローブとしてもよい。

#### 【0044】

これらのキャプチャプローブは、従来のDNAチップやタンパク質チップと同様に、公知の方法で基板上に配置することができる。例えば、DNAチップの場合には、基板上にDNA断片（例えば25mer程度）を合成する方法や、DNA断片をスポッティング法によって基板上に固定する方法を採用することができる。またスポッティング法の場合には、特開2001-116750号公報や特開2001-186881号公報に開示されているインクジェット方式を採用することが好ましい。スポッティングの後には、通常反応性チップ製造と同様にして、スポットに対する水分付加（湿度～80%程度に一定時間保持）、高温乾燥によるベーキング、薬液処理による固定化処理等を行うことによって、各スポットを基板上に固定する。さらに、スポッティング法による反応性チップの製造では、特開2001-186880号公報に開示されているような、スポッティング重ね打ちを行うようにしてもよい。タンパク質やペプチド、組織片や細胞等を固定する場合には、生体特異的吸着物質や有機高分子等を予めその固定面にコーティングし、このコーティング層にキャプチャプローブを固定するようにすればよい。

#### 【0045】

第1発明の反応性チップにおいて、キャプチャプローブは3以上の振動面にそれぞれ固定される。個々の「振動面」は、100～1000 $\mu$ m程度の距離をもって基板上に整列配置され、各振動面の大きさは、直径50～500 $\mu$ m程度の円形、または一辺が50～500 $\mu$ m程度の方形とすることができる。この振動面は、特定の周波数や振幅で振動する面である。このような振動面は、例えば、基板のプローブ固定面の下面に適当な振動発生装置（例えば、電気磁石や低周波発生装置）を配設することによって作成することができるが、この出願においては、第2発明の構成を好ましい態様とする。

## 【0046】

第2発明は、各振動面がそれぞれ、第1電極と第2電極間に圧電／電歪素子を介在させた振動部を有する反応性チップである。この場合の振動面は、例えば図1に示したような構造とすることができる。すなわち、図1の例では、第1電極(11)と第2電極(12)との間に圧電／電歪素子(20)を挿入して振動発生部(40)を構成し、この振動発生部(40)を基板(30)上に固定して振動面(50)としている。第1電極(11)と第2電極(12)に交流電圧を印加すると、圧電／電歪素子(20)が電圧周波数に応じて矢印X方向に連続的に伸縮するが、基板(30)は伸縮しないため、振動面(50)には結果として矢印Y方向の振動が発生する。振動の周期は電圧周波数に、振幅は電圧の大きさに応じて変化する。第1電極(11)、第2電極(12)および圧電／電歪素子(20)の関係は、図2および図3に例示したようにすることもできる。図2の例では、圧電／電歪素子(20)の上下に第1電極(11)を配し、圧電／電歪素子(20)の間に第2電極(12)を挿入している。この構成では、圧電／電歪素子(20)のX方向への伸縮が増すことによって、Y方向への振動量が大きくなる。また図3の例では、楕円の第1電極(11)および第2電極(12)を基板(30)上に対向並置し、その間に圧電／電歪素子(20)を配置している。この場合には、圧電／電歪素子(20)の電界誘起歪の縦効果を用いてY方向の振動を得ているため、少ない電圧で十分な振動を得ることができる。

## 【0047】

圧電／電歪素子(20)は、公知の圧電／電歪体または反強誘電体であって、例えば、ジルコン酸鉛、チタン酸鉛、マグネシウムニオブ酸鉛、ニッケルニオブ酸鉛、亜鉛ニオブ酸鉛、マンガンニオブ酸鉛、アンチモンスズ酸鉛、マンガンタングステン酸鉛、コバルトニオブ酸鉛、チタン酸バリウム等のセラミックスを単独で、あるいは、これらのいずれかを組み合わせた成分を含有するセラミックスを採用することができる。特に、ジルコン酸鉛とチタン酸鉛およびマグネシウムニオブ酸鉛からなる成分を主成分とする材料が好適に用いられる。このような材料は、高い電気機械結合係数と圧電定数を有することに加え、圧電／電歪素子(20)の焼結時における基板(30)との反応性が小さく、所定の組成のものを安定に形成することができるためである。

**【0048】**

さらに、上記のセラミックスに、ランタン、カルシウム、ストロンチウム、モリブデン、タングステン、バリウム、ニオブ、亜鉛、ニッケル、マンガン、セリウム、カドミウム、クロム、コバルト、アンチモン、鉄、イットリウム、タンタル、リチウム、ビスマス、スズ等の酸化物、もしくはこれらいずれかの組み合わせ、または他の化合物を適宜に添加したセラミックスを用いてもよい。たとえば、ジルコン酸鉛とチタン酸鉛およびマグネシウムニオブ酸鉛を主成分とし、これにランタンやストロンチウムを含有するセラミックスを用いることもまた好ましく、さらに、マンガンを加えたものは圧電材料の機械的品質係数（Q 値）が大きく、反応性チップの構造面からだけでなく、材料面からも Q 値を大きくすることができ、好ましい。

**【0049】**

第 1 電極（11）および第 2 電極（12）は、室温で固体である導電性の金属で構成されていることが好ましく、たとえば、アルミニウム、チタン、クロム、鉄、コバルト、ニッケル、銅、亜鉛、ニオブ、モリブデン、ルテニウム、パラジウム、ロジウム、銀、スズ、タンタル、タングステン、イリジウム、白金、金、鉛等の金属単体あるいはこれらのいずれかを組み合わせた合金を用いることができる。さらに、これらの金属に圧電／電歪素子（20）あるいは基板（30）と同じ材料を分散させたサーメット材料を用いてもよい。

**【0050】**

以上の材料によって振動発生部（40）および振動面（50）を形成するには、例えば、図 1 の構造の場合には、基板（30）上に第 2 電極（12）を形成した後、この第 2 電極（12）上に圧電／電歪素子（20）を焼成し、最後に第 1 電極（11）を形成する。あるいは第 1 電極（11）、第 2 電極（12）および圧電／電歪素子（20）を基板（30）上に一体焼成して形成することもできる。このような一体焼成による振動面（50）の成形は、図 2、図 3 の構造の場合には特に好ましい。

**【0051】**

さらに、第 1 電極（11）および第 2 電極（12）、並びにそれぞれのリード線の標識物質に接する箇所は絶縁被覆してもよい。この被覆材料としては、絶縁性の

ガラスまたは樹脂を使用することができる。樹脂としては、化学的安定性に優れたフッ素樹脂、例えば、四フッ化エチレン樹脂系テフロン（登録商標）（デュポン（株）製のテフロン（登録商標）PTFE）、四フッ化エチレン・六フッ化プロピレン共重合体樹脂系テフロン（登録商標）（テフロン（登録商標）FEP）、四フッ化エチレン・パーフロロアルキルビニルエーテル共重合体樹脂系テフロン（登録商標）（テフロン（登録商標）PFA）、PTFE/PFA複合テフロン（登録商標）等が例示できる。また、シリコン樹脂（中でも熱硬化型のシリコン樹脂）や、エポキシ樹脂、アクリル樹脂等も目的に応じて使用することができる。さらに、絶縁性樹脂に無機・有機充填材を添加し、振動面（50）の剛性を調整することも好ましい。

#### 【0052】

なお、振動面（50）の厚みを薄くすると、例えば、後述する共振周波数測定の際の感度が向上するが、その一方で、剛性が低下するといった問題が生ずるため、基板（30）および振動発生部（40）からなる振動面（50）の厚みの合計は5～50 $\mu$ m程度とすることが好ましい。

#### 【0053】

図4は、第2発明の反応性チップの一実施例を示した側断面図である。この図4に例示した反応性チップは、基板（30）の表面に第2電極（12）、圧電／電歪素子（20）および第1電極（11）を積層一体化している。そして、第1電極（11）の表面にキャプチャプローブ（60）を配設している。キャプチャプローブ（60）は、この図4の例のように振動発生部（40）の表面に直接固定することもでき、または図5に例示したように、振動発生部（40）の表面をコーティングし、このコーティング層（70）にキャプチャプローブ（60）を固定するようにしてもよい（第3発明）。すなわち、このコーティング層（70）は、キャプチャプローブ（60）の固定を容易とするための材料であって、キャプチャプローブ（60）の種類によって、例えばポリヌクレオチドLリジン層、 $\gamma$ アミノプロピルトリエトキシラン等のシラン剤およびその誘導体、ビオチン／アビジン等の生体特異的吸着物質、ポリアクリルアミドやナイロン膜等の有機高分子等から適宜に選択される。

## 【 0 0 5 4 】

図 4 および図 5 の例において、基板 (30) は、肉薄領域 (31) とその周囲の肉厚領域 (32) とを有し、肉薄領域 (31) が、その上面に振動発生部 (40) を備えた振動面 (50) となっている (第 4 発明)。このような肉薄領域 (31) と肉厚領域 (32) を設けることによって、反応性チップ全体の剛性を維持し、かつ振動面 (50) において好適な振動を発生させることができる。この肉厚領域 (32) と肉薄領域 (31) は、例えば図 6 に例示したように、肉厚領域 (32) の下端を延設させて、肉薄領域 (31) の下方を空洞とすることもできる。このような構造は、基板 (30) の全体的剛性の向上のために好ましい。

## 【 0 0 5 5 】

さらにまた、この発明の反応性チップは、図 7 に例示したように、その振動発生部 (40) を基板の肉薄領域 (31) の下方に配設することもできる (第 5 発明)。このように構成を採用することによって、表面がフラットな反応性チップが容易に実現できる。また、振動発生部 (40) がサンプル溶液に直接接触することがないため、チップの耐久性が向上し、さらに、後述する共振周波数の測定の場合にもノイズの影響を排除してより正確な測定が可能となる。

## 【 0 0 5 6 】

この発明の反応性チップは、さらに別の態様として、図 7 の平面図に例示したように、それぞれの振動発生部 (40) から引き出される第 1 電極 (11) と第 2 電極 (12) のそれぞれのリード線 (13) (14) を、振動発生部毎に独立とすることができる (第 6 発明)。これによって、それぞれの振動面 (50) を異なった周波数または振幅で振動させることが可能となる。あるいは、さらに別の態様として、第 1 電極 (11) と第 2 電極 (12) のいずれか一方のリード線を共通とすることもできる (第 7 発明)。例えば、図 8 の例では、第 1 電極 (11) のリード線 (13) を共通としており、リード線の加工を簡略化することが可能となる。また、4 以上の振動面を格子状に配置する場合には、同一列の振動面における電極リード線を共通とし、この同一列の振動面を同一振幅で振動させるようにしてもよい。

## 【 0 0 5 7 】

この出願の第 8 発明の反応性チップは、振動面の共振周波数を測定する手段を

有している。この共振周波数の測定に関する原理と具体的方法等は、この出願人が先に特許出願した発明（再表99/034176公報、特開平08-201265号公報）と基本的に同一であり、再表99/034176公報および特開平08-201265号公報に記載の方法に従って測定手段を構成することができる。すなわち、このような共振周波数は、具体的には、振動面に外部から何らかの物質が付着した時や、振動面に接するサンプル液の比重や粘度が変化した時に、振動面の共振周波数が変化することを、圧電／電歪素子を含む回路の電気的定数の変化として検出することができる。

#### 【 0 0 5 8 】

この出願の第 9 発明の反応性チップは、第 1 電極表面がキャプチャープローブ固定面であり、第 1 電極および第 2 電極が、交流電源に加え、さらに直流電源にも導通している。すなわち、この反応性チップは、第 1 電極および第 2 電極に対する交流電源の通電によって振動面を振動させることができることに加え、キャプチャープローブ固定面である第 1 電極に正または負の直流電流を通電させることができる。このような直流電流の通電は、特表2001-501301号公報の記載に準じて行うことができる。

#### 【 0 0 5 9 】

第 1 0 発明は、各振動面に、それぞれ異種のキャプチャープローブを固定した反応性チップである。この場合の「異種」とは、例えばDNA断片であればそれぞれの塩基配列が異なること、ペプチドであればアミノ酸配列が異なることを意味する。例えば、図 9 の例では、16個の振動面にA～Pまでの異なるキャプチャープローブが固定されている。そして、この第 1 0 発明の反応性チップは、第 1 9 発明の標的物質検出方法に使用することができる。

#### 【 0 0 6 0 】

発明 1 9 の方法は、キャプチャープローブと結合する標的物質を検出する方法であって、前記第 1 0 発明の反応性チップの振動面を振動させた状態で、標識化標的物質を含む試料を反応性チップのキャプチャープローブに接触させ、振動面の振動を停止し、標識を指標としてキャプチャープローブに結合した標的物質を検出することを特徴とする。

#### 【 0 0 6 1 】

この発明の方法は、通常の反応性チップにおける標的物質の検出に際して「キャプチャープローブ固定面を振動させる」工程を付加することを特徴とする。すなわち、この振動によって、反応性チップに接触するサンプル溶液内の標的物質が、自然拡散の程度よりもさらに強く拡散され、その結果として、標的物質とキャプチャープローブとの特異的結合が促進される。さらに、キャプチャープローブを振動させた状態でハイブリダイゼーションを行うことによって、ミスマッチによる結合や非特異的吸着を排除または低減することができる。これによって、単一塩基が異なるDNA断片（例えばSNPs）や立体構造の異なる分子を、それぞれに対応したキャプチャープローブへの結合として検出することが可能となる。

#### 【0 0 6 2】

なお、振動面を振動させる時間間隔は、キャプチャープローブや標的物質の種類等に応じて適宜に設定することができるが、例えばDNAチップの場合は1秒～32時間程度とすることができる。また、振動面の振動周波数は、10～1 MHz程度、振幅は0.001～10  $\mu$ m程度とすることができる。

#### 【0 0 6 3】

この方法において、標的物質の標識化は、その物質の種類に応じて、酵素、放射性同位体、蛍光色素、蛍光タンパク質等を使用することができる。酵素は、turnover numberが大であること、抗体と結合させても安定であること、基質を特異的に着色させる等の条件を満たすものであれば特段の制限はなく、例えば、ペルオキシダーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、グルコース-6-リン酸化脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素等を用いることもできる。また、酵素阻害物質や補酵素等を用いることもできる。基質としては、使用する酵素の種類に応じて公知の物質を使用することができる。例えば酵素としてペルオキシダーゼを使用する場合には、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン（TMB）を、また酵素としてアルカリフォスファターゼを用いる場合には、パラニトロフェノール等を用いることができる。放射性同位体としては、 $^{125}\text{I}$  や $^3\text{H}$  等を、蛍光色素としては、フルオレッセンスイソチオシアネート（FITC）やテトラメチルローダミンイソチオシアネート（TRITC）等を使用することができる。また、蛍光タンパク質とは励起光を照射

すると蛍光を発するタンパク質であり、例えば、発光クラゲ由来の緑色蛍光蛋白質(GFP)や、その変異体であるEGFP、EYFP(黄色蛍光)、ECFP(青色蛍光)、DsRed1(赤色蛍光)、DsRed2、ウミシイタケ由来の緑色蛍光蛋白質hrGFPなどが例示できる。以上のとおりの標識物質と標的物質とは、例えば、水素結合、疎水結合、イオン結合、配位結合等に基づく結合によって一体化することができる。さらにまた、蛍光タンパク質はそれをコードするポリヌクレオチド配列が公知であることから、蛍光タンパク質標識化DNA断片や蛍光タンパク質標識化タンパク質またはペプチド等は公知の遺伝子工学的方法によって容易に調製することもできる。

#### 【0064】

以上の標識を指標としてキャプチャプローブに結合した標的物質を検出するには、例えば酵素標識の場合には、酵素作用によって分解して発色する基質を加え、基質の分解量を光学的に測定することによって酵素活性を求め、これを結合標的物質質量に換算し、標準値との比較から標的物質質量が算出される。放射生同位体を用いる場合には、放射性同位体の発する放射線量をシンチレーションカウンタ等により測定する。また、蛍光色素や蛍光タンパク質を用いる場合には、蛍光顕微鏡を組み合わせた測定装置によって蛍光量を測定すればよい。

#### 【0065】

第11発明の反応性チップは、前記第10発明の反応性チップの一態様であって、前記第8発明と同様に「圧電／電歪素子の共振周波数を測定する手段」を有する反応性チップである。この第11発明の反応性チップは、第20発明の標的物質検出方法に使用することができる。

#### 【0066】

第20発明の方法は、キャプチャプローブと結合する標的物質を検出する方法であって、前記第11発明の反応性チップの振動面を振動させた状態で、標的物質を含む試料を反応性チップのプローブに接触させ、圧電／電歪素子の共振周波数の変化を指標として標的物質を検出することを特徴としている。

#### 【0067】

すなわち、この方法は、キャプチャプローブへの標的物質の結合によって生



じる振動面の共振周波数の変化を指標として標的物質の検出を行う方法である。この方法によれば、標的物質を標識することなく検出することが可能となる。また、標的物質の結合量を、経時的にリアルタイムで測定することもできる。さらに、標的物質を標識して、前記第19発明の方法と同様に標識を指標とする検出と組み合わせて、より高精度の検出を行うこともできる。

#### 【0068】

さらに第11発明の反応性チップは、第21発明の標的物質検出方法に使用することもできる。

#### 【0069】

第21発明の方法は、前記第20発明の方法の一態様であって、反応性チップの振動面を振動させると共に、温度を経時的に変化させた状態でプローブに試料を接触させ、圧電／電歪素子の共振周波数の変化を指標として標的物質を経時的に検出する方法である。例えば、DNAチップの場合、振動面を振動させた状態でハイブリダイゼーション反応の温度を38～98℃程度まで一定の時間内（例えば10分間隔）で変化させ、その間にキャプチャープローブDNAにハイブリダイズした標的DNAの質量を測定することによって、各標識DNAのT<sub>m</sub>（融解温度）を検出することができる。

#### 【0070】

第12発明の反応性チップは、前記第10発明の別の態様であって、第1電極表面がキャプチャープローブ固定面であり、第1電極および第2電極が、交流電源に加え、さらに直流電源にも導通している反応性チップである。この第12発明のチップは、第22発明の標的物質検出方法に使用することができる。

#### 【0071】

第22発明の方法は、キャプチャープローブと結合する標的物質を検出する方法であって、前記第12発明の反応性チップの振動面を振動させた状態で、標識化標的物質を含む試料を反応性チップのプローブに接触させ、振動面の振動を停止した後、キャプチャープローブ固定面である第1電極に負の直流電流を一定時間通電し、標識を指標としてキャプチャープローブに結合した標的物質を検出することを特徴とする。この方法は、前記第19発明の方法と、特表平09-503307

号公報、特表2001-501301号公報等に記載されたナノチップによる方法とを組み合わせたものであり、特に前記第12発明の反応性チップをDNAチップとして使用するための方法である。キャプチャプローブ固定面の振動と、キャプチャプローブを負に電荷させることを組み合わせることによって、標識DNAとプローブDNAのミスマッチ結合を効率良く排除することができる。

#### 【0072】

直流電流は、使用される溶液、振動面の寸法、DNAの濃度等により適宜とすることができるが、0.1～1000ナノアンペア、好ましくは1～30ナノアンペア程度の電流を1～180秒、好ましくは10～60秒程度、通電させることができる。

#### 【0073】

次に、第13発明の反応性チップは、前記第2から第7発明のさらにまた別の態様であって、3以上の振動面を同一列、または4以上の振動面を  $n$  ( $n$ は2以上)  $\times m$  ( $m$ は2以上) の格子状に整列配置し、同一列の各振動面に同一種のキャプチャプローブを固定した反応性チップである。

#### 【0074】

この場合の「同一種」とは、例えばDNA断片であればそれぞれの塩基配列が全く同一であること、ペプチドであればアミノ酸配列が完全に同一であることを意味する。例えば、図10の例では、第1列の4つの振動面にそれぞれ同一のキャプチャプローブ (A) が固定されており、第2～4列には、それぞれ同一のキャプチャプローブ (B)、(C) および (D) が固定されている。そして、この第13発明の反応性チップは、第23発明の標的物質検出方法に使用することができる。

#### 【0075】

第23発明の方法は、複数種の標的物質のキャプチャプローブに対する親和性を検出する方法であって、前記第13発明の反応性チップの同一列振動面の各振動面を異なる振幅で振動させた状態で、各種の標識化標的物質を反応性チップのキャプチャプローブに接触させ、振動面の振動を停止し、標識を指標としてキャプチャプローブに結合した標的物質のそれぞれのプローブに対する親和性の程度を検出することを特徴とする。

## 【0076】

すなわちこの方法によれば、同一列振動面の各振動面を異なる振幅で振動させた状態で、標的物質とキャプチャプローブとのハイブリダイゼーションを行い、標識を指標としてプローブに結合した標的物質を検出することによって、親和力の強い標的物質から順次にソーティングすることが可能となる。また、第14発明の反応性チップを用いた第24発明の方法では、共振周波数の違いによって測定される質量を指標として経時的なソーティングを行いことができ、第25発明の方法では、温度変化を伴うハイブリダイゼーションをすることができる。さらに、第15発明の反応性チップを用いた第26発明の方法では、キャプチャプローブ固定面の振動と、キャプチャプローブを負に電荷させることを組み合わせることによって、標識DNAとプローブDNAとの親和性をさらに高精度で検出することができる。

## 【0077】

第16発明の反応性チップは、前記第2から第7発明のまたさらに別の態様であって、3以上の振動面を同一列、または4以上の振動面を $n$  ( $n$ は2以上) $\times$   $m$  ( $m$ は2以上)の格子状に整列配置し、同一列の振動面に、標的物質の異なる部位に結合するキャプチャプローブをそれぞれ固定した反応性チップである。この場合の「標的物質の異なる部位に結合する」とは、例えばDNA断片であればその塩基配列の異なる領域に結合すること、ペプチドであればその全長アミノ酸配列の異なる領域に結合することを意味する。例えば、図11の例では、染色体DNA (A)の端から順次に4つの領域に対応するキャプチャプローブA1~A4を第1列の4つの振動面に固定し、第2~4列には染色体(B)~(D)の4領域に対応するキャプチャプローブをそれぞれ固定している。また、図12の例では、4 $\times$ 4の格子状の振動面に、染色体DNA (A)の端から順次に4つの領域の様々な組み合わせに対応するキャプチャプローブをそれぞれ固定している。

## 【0078】

そして、このような第16発明の反応性チップは、第27発明の標的物質検出方法に使用することができる。

## 【0079】

第27発明の方法は、標記物質の変異を検出する方法であって、前記第16発明の反応性チップの同一列振動面を振動させた状態で、標識化標的物質含む試料を反応性チップのキャプチャープローブに接触させ、振動面の振動を停止し、標識を指標としてキャプチャープローブに結合した標的物質を検出することによって、標的物質の変異を検出することを特徴とする。ここで、「変異」とは欠失、置換、挿入、増幅、反復等を意味する。さらに具体的には、染色体DNAのこれらの変異や、それに対応したmRNAやcDNAの変異、あるいはそれらの発現産物であるタンパク質やペプチドの同様の変異を意味する。

#### 【0080】

例えば、図11の構成でキャプチャープローブを固定した場合、標的物質（染色体DNA）が正常であれば、図11の右図に示したように、各プローブに対してそれぞれに標的物質が結合する。しかし、図13に示したようにプローブ3および4に対する結合量が2倍となる場合には、これらのプローブ3および4に対応する染色体DNA領域3-4が増幅していることを検出することができる。また、図14に示したように、プローブ1、2および4には結合し、プローブ3に対する結合がない場合には、プローブ3に対応する染色体DNA領域3が欠失していることを検出することができる。

#### 【0081】

さらに、図12の構成でキャプチャープローブを固定することによって、例えば染色体DNAの挿入や置換を検出することができる。例えば、図15の左欄に示したように、標的物質（染色体DNA）がA1～A4単独のプローブ、およびA1+2とA3+4のプローブに結合した場合には、図15の右欄に示したように染色体DNAの領域2と3の間にX配列が挿入していることを検出できる。また、図16の左欄に示したように、染色体DNAがA1～A4単独のプローブ、A1+2、A2+4、A3+4、A1+2+4プローブに結合した場合には、図16の右欄に示したように染色体DNAの領域3と4が置換していることを検出できる。

#### 【0082】

また、第17発明の反応性チップを用いた第28発明の方法では、共振周波数の違いによって測定される質量を指標として標的物質の変異を検出することがで

きる。例えば図 13 の例では質量は $6/4$ 倍に、図 14 の例では質量は $3/4$ 倍として検出される。さらに、第 18 発明の反応性チップを用いた第 29 発明の方法では、キャプチャープローブ固定面の振動と、キャプチャープローブを負に電荷させることを組み合わせることによって、標識 DNA における変異をさらに高精度で検出することができる。

#### 【0083】

もちろん、この出願の発明は以上の例によって限定されるものではなく、細部については様々な態様が可能であることは言うまでもない。

#### 【0084】

##### 【発明の効果】

以上詳しく説明したとおり、この出願の発明によって、広範な標的物質に対して、反応時間の短縮を可能とし、しかもミスマッチ結合を効果的に予防して高精度な検出を可能とする新しい反応性チップが提供さえる。また、この反応性チップを用いた新しい標的物質検出方法が提供される。この検出方法では、従来の反応性チップでは不可能であった、標的物質の微量な相違をも検出することが可能となる。

##### 【図面の簡単な説明】

##### 【図 1】

この発明の反応性チップにおける基本構造の一例を示した側面図である。

##### 【図 2】

この発明の反応性チップにおける基本構造の別の例を示した側面図である。

##### 【図 3】

この発明の反応性チップにおける基本構造のさらに別の例を示した平面図および側面図である。

##### 【図 4】

この発明の反応性チップの一実施例を示した側面図である。

##### 【図 5】

この発明の反応性チップの別の実施例を示した側面図である。

##### 【図 6】

この発明の反応性チップのさらに別の実施例を示した側面図である。

【図 7】

この発明の反応性チップのまたさらに別の実施例を示した平面図および側面図である。

【図 8】

この発明の反応性チップのさらにまた別の実施例を示した平面図である。

【図 9】

この発明の反応性チップにおけるキャプチャプローブの配置例を示した模式図である。四角は振動面を示し、アルファベット文字の違いは、キャプチャプローブが異なることを示す。

【図 1 0】

この発明の反応性チップにおけるキャプチャプローブの別の配置例を示した模式図である。四角は振動面を示し、アルファベット文字の違いは、キャプチャプローブが異なることを示す。

【図 1 1】

この発明の反応性チップにおけるキャプチャプローブのさらに別の配置例を示した模式図（左）と、この反応性チップを用いて染色体異常等を検出した場合の正常染色体の結合状態を例示した模式図（右）である。四角は振動面を示し、横方向の振動面に連通する波線は振動子を示す。アルファベット文字および数字の違いは、キャプチャプローブが異なることを示す。

【図 1 2】

この発明の反応性チップにおけるキャプチャプローブのまたさらに別の配置例を示した模式図である。四角は振動面を示し、アルファベット文字および数字の違いは、キャプチャプローブが異なることを示す。

【図 1 3】

図 1 1 に例示したキャプチャプローブの配置例（左）と、この反応性チップを用いて染色体異常（増幅）を検出した場合の結合状態を例示した模式図（右）である。四角は振動面を示し、横方向の振動面に連通する波線は振動子を示す。アルファベット文字および数字の違いは、キャプチャプローブが異なることを示す。

示す。

【図 1 4】

図 1 1 に例示したキャプチャプローブの配置例（左）と、この反応性チップを用いて染色体異常（欠失）を検出した場合の結合状態を例示した模式図（右）である。四角は振動面を示し、横方向の振動面に連通する波線は振動子を示す。アルファベット文字および数字の違いは、キャプチャプローブが異なることを示す。

【図 1 5】

図 1 2 に例示したキャプチャプローブの配置例（左）と、この反応性チップを用いて染色体異常（挿入）を検出したの結合状態を例示した模式図（右）である。四角は振動面を示し、アルファベット文字および数字の違いは、キャプチャプローブが異なることを示す。

【図 1 6】

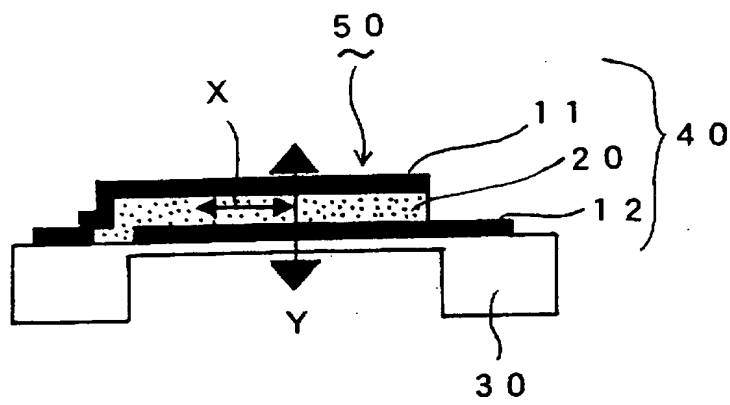
図 1 2 に例示したキャプチャプローブの配置例（左）と、この反応性チップを用いて染色体異常（置換）を検出したの結合状態を例示した模式図（右）である。四角は振動面を示し、アルファベット文字および数字の違いは、キャプチャプローブが異なることを示す。

【符号の説明】

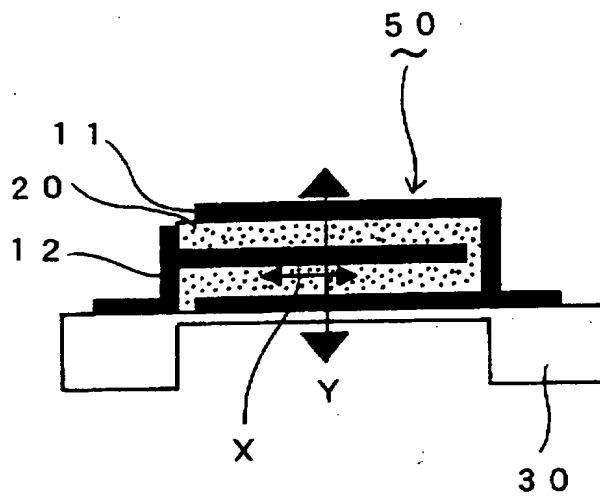
- 11 第 1 電極
- 12 第 2 電極
- 13、14 リード線
- 20 圧電／電歪素子
- 30 基板
- 31 肉薄領域
- 32 肉厚領域
- 40 振動発生部
- 50 振動面
- 60 キャプチャプローブ
- 70 コーティング層

【書類名】 図面

【図 1】

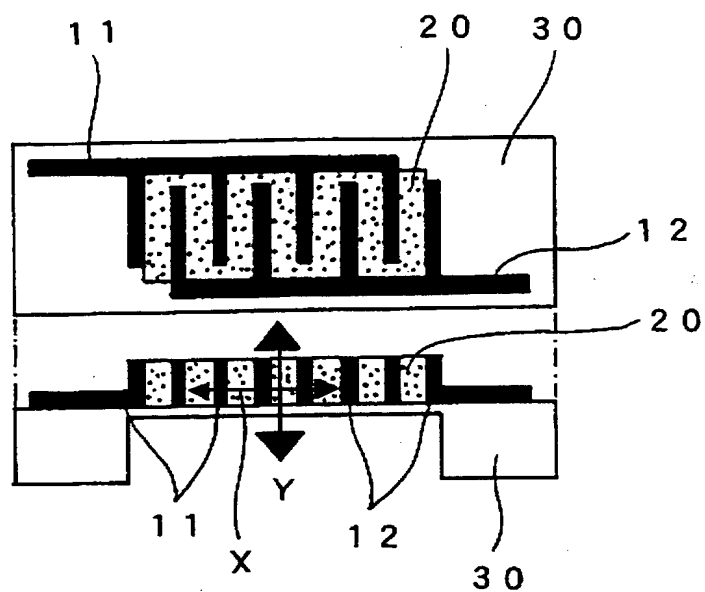


【図 2】

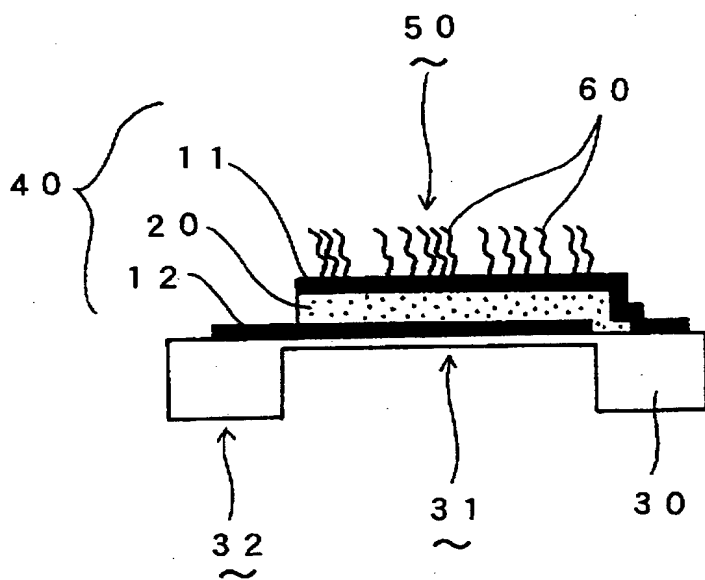




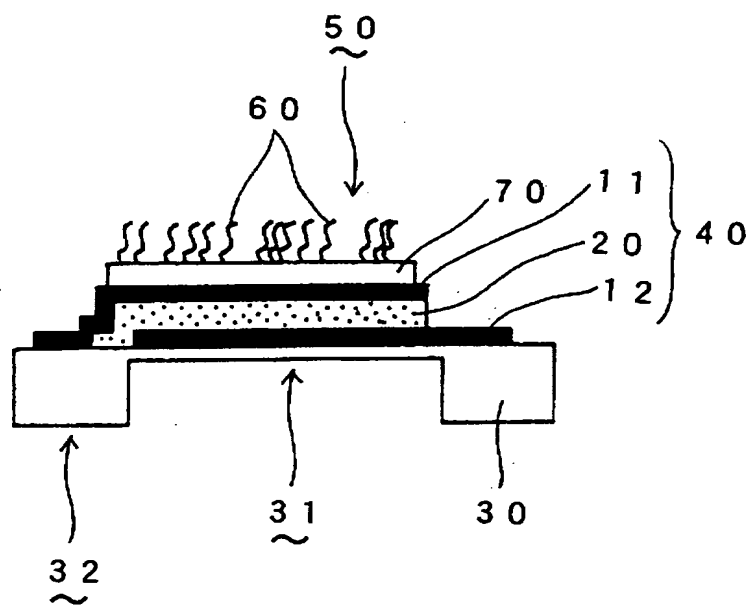
【図 3】



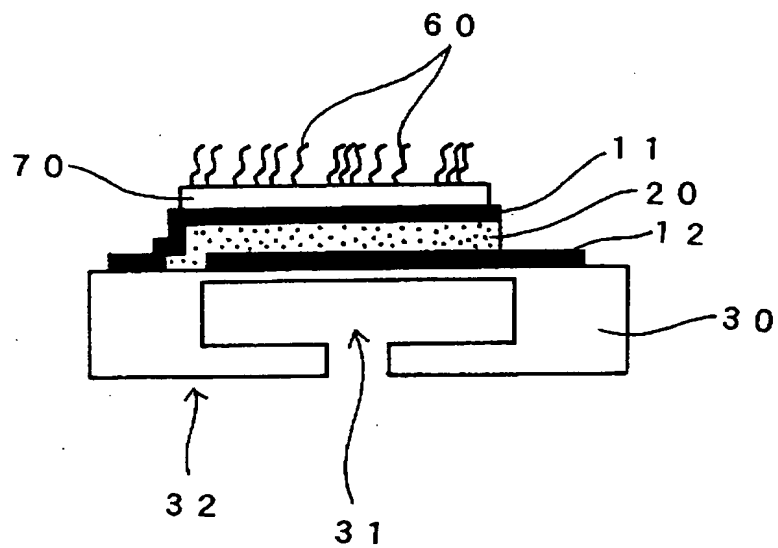
【図 4】



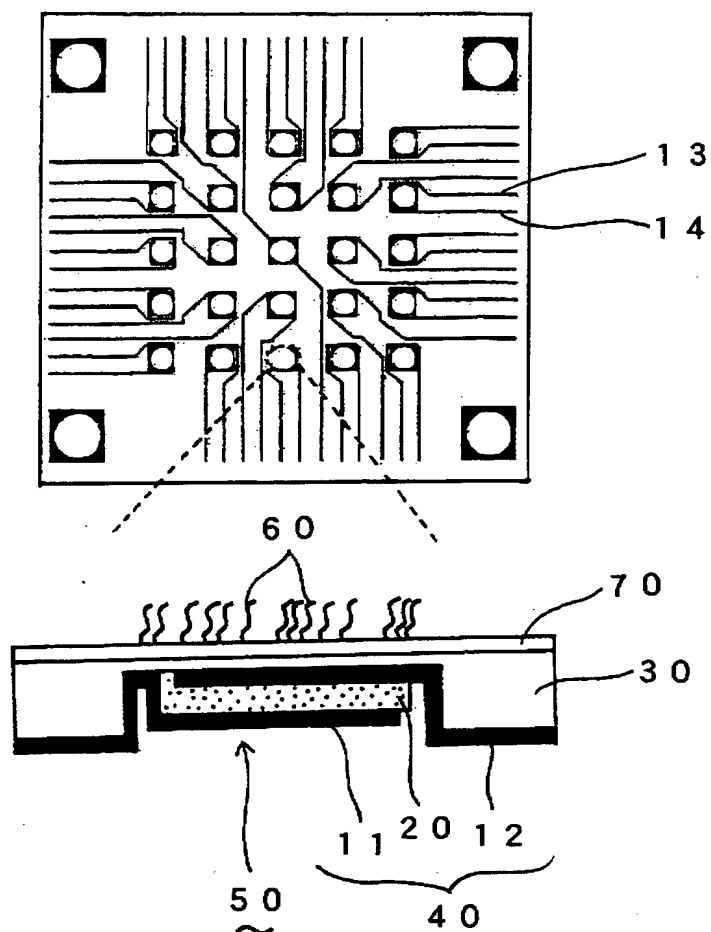
【図 5】



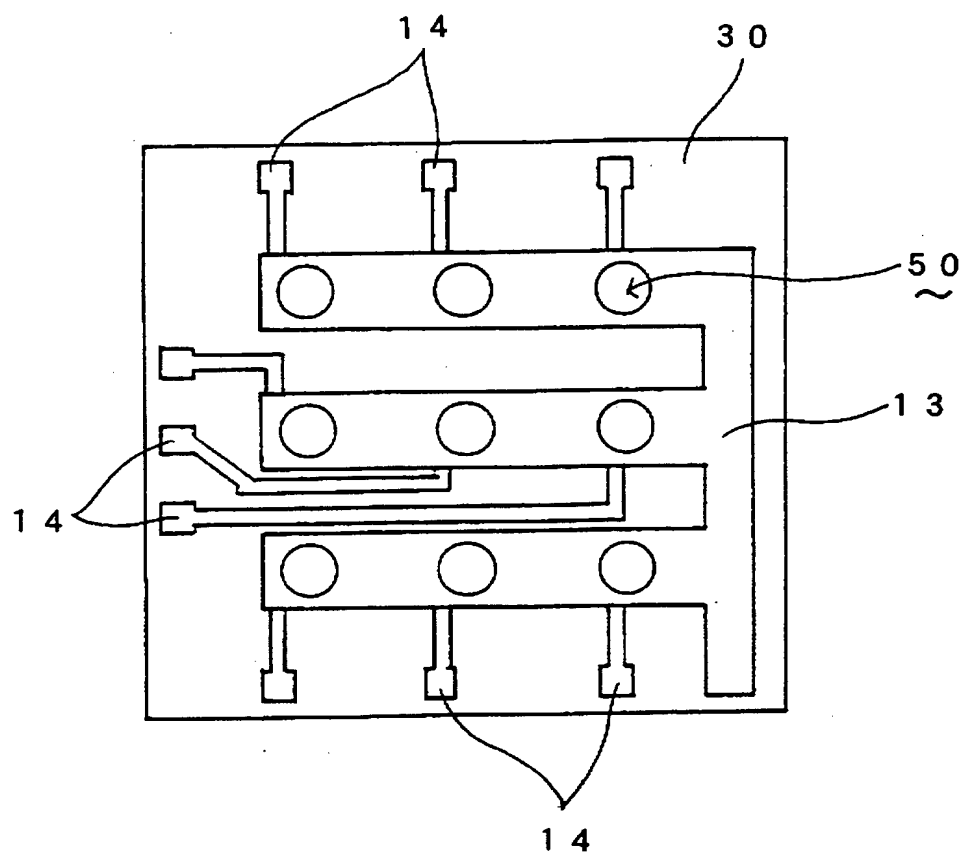
【図 6】



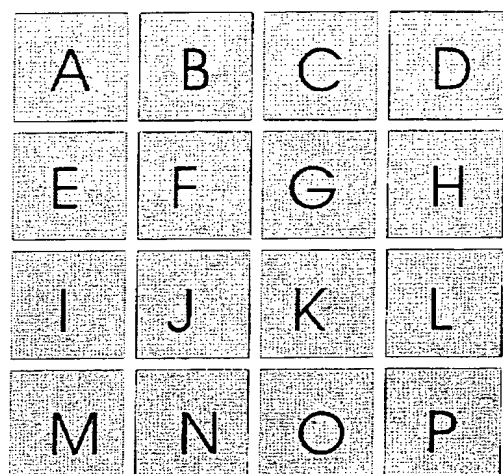
【図 7】



【図 8】



【図 9】




【図 10】

|   |   |   |   |
|---|---|---|---|
| A | A | A | A |
| B | B | B | B |
| C | C | C | C |
| D | D | D | D |

【図 11】

|    |    |    |    |
|----|----|----|----|
| A1 | A2 | A3 | A4 |
| B1 | B2 | B3 | B4 |
| C1 | C2 | C3 | C4 |
| D1 | D2 | D3 | D4 |

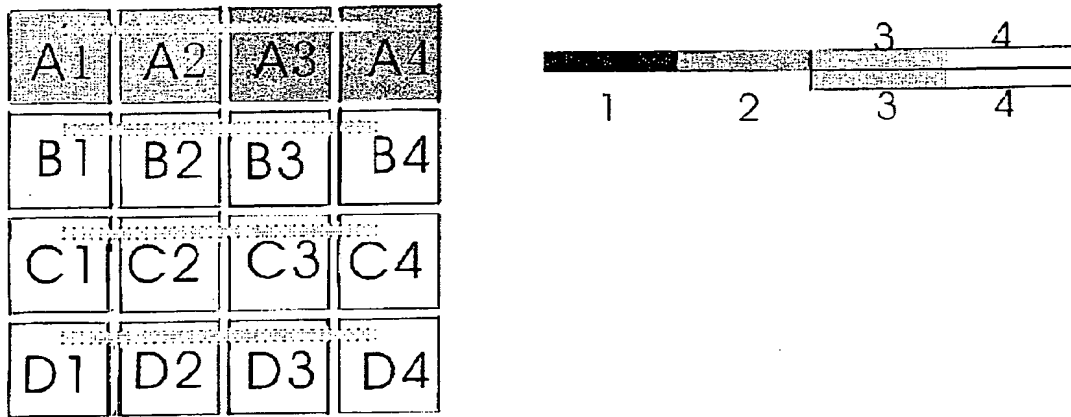
1234



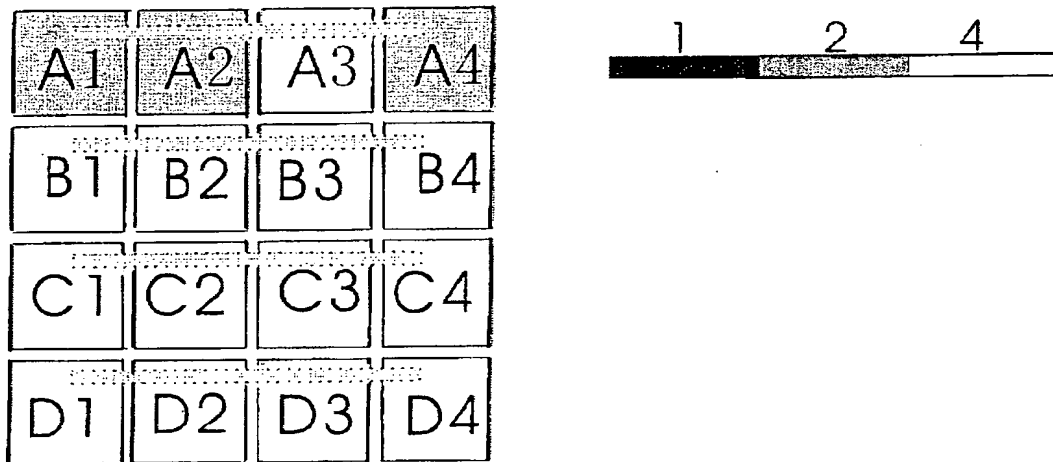
【図 12】

|    |      |              |            |
|----|------|--------------|------------|
| A1 | A1+2 | A1+3         | A1+2<br>+3 |
| A2 | A2+3 | A2+4         | A2+3<br>+4 |
| A3 | A3+4 | A1+2<br>+3+4 | A1+3<br>+4 |
| A4 | A1+4 | C            | A1+2<br>+4 |

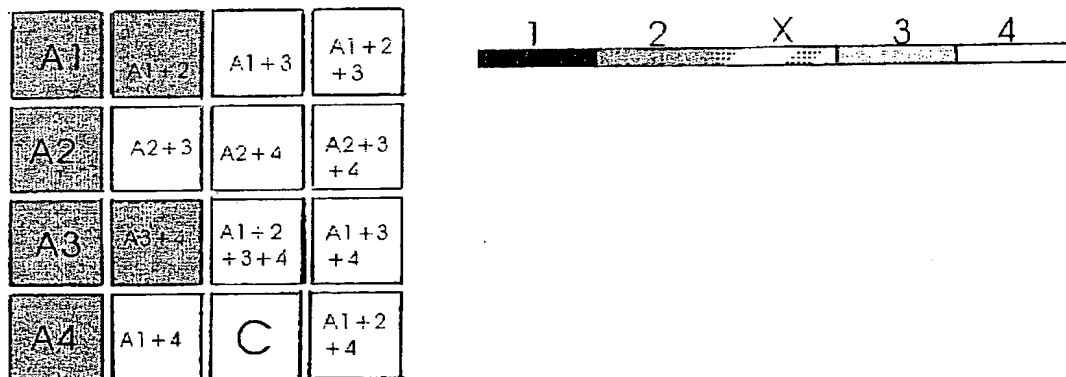
【図 13】



【図 14】



【図 15】



【図 16】

|    |      |              |            |
|----|------|--------------|------------|
| A1 | A1+2 | A1+3         | A1+2<br>+3 |
| A2 | A2+3 | A2+4         | A2+3<br>+4 |
| A3 | A3+4 | A1+2<br>+3+4 | A1+3<br>+4 |
| A4 | A1+4 | C            | A1+2<br>+4 |



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 広範な標的物質に対して、反応時間の短縮を可能とし、しかもミスマッチ結合を効果的に予防して高精度な検出を可能とする新しい反応性チップを提供する。

【解決手段】 基板（30）上に整列配置された 3 以上の振動面（50）のそれぞれに、標的物質に結合するキャプチャプローブ（60）が固定されており、各振動面は第 1 電極（11）と第 2 電極（12）間に圧電／電歪素子（20）を介在させた振動発生部（40）を有する。

【選択図】 図 4



特願 2 0 0 3 - 0 0 1 5 7 7

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 0 0 4 0 6 4 ]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 2 4 日

[変更理由]

新規登録

住 所

愛知県名古屋市瑞穂区須田町 2 番 5 6 号

氏 名

日本碍子株式会社